植 物 分 类 学 报　44 (3): 320–326(2006)　　doi:10.1360/aps050007
Acta Phytotaxonomica Sinica　　http://www.plantsystematics.com

传粉生物学中几种花蜜采集和糖浓度测定方法的比较

李左栋　刘静萱　黄双全*
(武汉大学生命科学学院　武汉　430072)

A comparison of several methods used in the field for nectar collection and concentration analysis

LI Zuo-Dong　LIU Jing-Xuan　HUANG Shuang-Quan*
(*College of Life Sciences*, *Wuhan University*, Wuhan 430072, China)

Abstract　Techniques for collecting and measuring floral nectar are essential in many studies of pollination biology. In order to test the effectiveness of different methods for collecting nectar from small flowers, we used microcapillary tubes, calibrated syringes, wicks and centrifugation to collect floral nectar in five species (*Sagittaria trifolia* L., *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland, *Dolichos lablab* L., *Rostellularia procumbens* (L.) Nees, and *Polygonum caespitosum* L.). We also used hand-held refractometer to analyze the nectar sugar content. The results have shown that the applicability of one method varied with the floral shape and structure, nectar volume and the nectar location. It is better to use different methods to measure different flowers. For studies in the field, the techniques of using capillary tubes to collect nectar and hand-held refractometer to measure sugar content are recommended. If the flowers are too small to collect with capillary tubes, we suggest centrifugation as an alternative method to extract nectar in the laboratory.
Key words　Floral nectar, nectar collection, sugar analysis, microcapillary tube, hand-held refractometer, pollination biology.

摘要　花蜜的研究是花生物学中的一个重要内容，探寻实用的方法将方便野外操作。我们分别运用毛细管、注射器、滤纸条和离心法采集了5种花的花蜜，以比较各种方法的优劣，并用3种旋光测糖仪测量了慈姑*Sagittaria trifolia* L.的雌雄花的花蜜糖含量。目的是为寻找一种适合小型花的花蜜采集测量方法。结果表明，几种方法的适用性受花的大小、形状、蜜的分泌量及蜜腺位置的影响非常大，不同的花要采用不同的方法。对于一般的野外工作建议用毛细管采集后使用便携式旋光测糖仪测其糖含量。特别小的花和蜜量微小的花可以采用离心法收集。
关键词　花蜜；花蜜采集；糖含量测定；毛细管；手持式折光仪；传粉生物学

花蜜是陆生植物提供给食蜜动物(nectarivore)的一种独特的资源。长期以来，人们对花蜜的生物学意义的理解停留在花蜜是传粉者的食物报酬这一层面。在Baker和Baker(1973)发现花蜜成分中氨基酸浓度与传粉者的类型有紧密联系之后，花蜜化学成分的研究才引起传粉生物学家的关注。相对于花的颜色、形状、大小和花粉等的研究，有

———————————
2005-01-20 收稿, 2005-08-15 收修改稿。
基金项目：国家自然科学基金项目(30400025)(Supported by the National Natural Science Foundation of China, Grant No. 30400025)。
* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: sqhuang@whu.edu.cn)。

关花蜜的生物学研究还很缺乏。其中一个重要原因是由于花蜜特征(包括分泌速率和组成成分等)的易变性。花蜜的特征不仅在开花的不同时期和一天内不同时段不同，而且随生物和非生物的环境发生变化。另外，花蜜成分的复杂性需要精密的仪器来分析，也在一定程度上阻碍了花蜜研究工作的开展。

然而，最近的一些研究表明，花蜜与传粉者之外的多种访花者发生相互作用。花蜜可能被一些非传粉的动物消耗，使植物面临两难的境地，即防御非传粉的动物同时不伤害传粉者(Adler, 2000)。如许多植物产生有毒的花蜜来防御植食动物，非传粉的访花者给植物带来的选择将可能与传粉者的选择相冲突。花蜜的进化生态学和群落生态学为动植物相互作用的研究提供了一个广阔的天地(Irwin et al., 2004)。但有关花蜜的进化生态学研究在我国还几乎是空白。

Kearns和Inouye(1993)将不同学者使用过的多种花蜜采集和分析技术进行了总结。但是在实践中，很多学者通常采用毛细管采集花蜜和用手持式折光仪测量糖浓度。由于花的形态结构和花蜜产生的部位、蜜量和分泌的速率在不同物种有很大差异，常用的方法很可能不能准确测量(Mallick, 2000)。最近, Corbet(2003)结合自己25年的经验综述了适合野外操作的方法，仍推崇这两种方法。本文对比了几种在传粉生物学中广泛采用的花蜜采集方法，目的是验证这些方法的可操作性，希望为花蜜的生物学研究提供借鉴。

1　花蜜的采集

我们分别使用毛细管、滤纸条、微量加样器和离心法对武汉大学校园内的慈姑*Sagittaria trifolia* L.、香薷*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyland.、扁豆*Dolichos lablab* L.、爵床*Rostellularia procumbens* (L.) Nees、丛枝蓼*Polygonum caespitosum* Bl.等5种植物的花蜜进行了采集，比较各种方法对不同花的适用性。对采过花蜜的花进行解剖观察其残留蜜量的多少，以鉴别每种方法对各种花蜜的采集是否彻底。(由于所使用的花都未进行套袋，所以比较方法的适用性时，不是比较采集到的蜜量的多少，而是比较采集后解剖镜下观察到的花蜜残余量。)

1.1　毛细管法

毛细管法是一种很方便同时适用性也很强的方法。1–20 μL的毛细管对大多数花采蜜的效果都很好，如果使用50 μL的毛细管时(由于内径较大，毛细作用较弱)应小心花蜜从管中流出。使用毛细管测量体积的计算公式为:

花蜜体积=(毛细管中液柱长/毛细管总长)×毛细管的总体积(Cruden & Hermann, 1983)。我们使用的毛细管是德国Hirschmann Laborgerate生产的，规格从0.5、1、2、3、4、5、10、20到50 μL不等。

1.1.1　慈姑　蜜量较少，采用1 μL的毛细管。雌花：将毛细管轻轻与雌蕊群基部接触，不要伤及组织。沿雌蕊群基部移动毛细管几周，直至不能吸上。解剖镜下观察发现有极其微量的蜜残留。雄花：先将花粉用软毛刷轻轻地粘去，以免堵塞毛细管。花丝处组织的含水量较大，注意不要损伤，否则会有较多的组织液污染。解剖镜下观察采过蜜的花，在花丝丛生的基部留住了较多的花蜜。毛细管壁上也不可避免地粘有花粉，有时花粉还会

堵塞毛细管。

1.1.2 扁豆 选择5 μL的毛细管。反复采集多次，尽量采集完全。在解剖镜下观察采过蜜的花，发现有很多的蜜残留。如果不需要保持花的完整性时可将花解剖开再用毛细管收集，这样收集得会完全些，不过会有少量组织液渗出，不适合做花蜜成分分析，但对体积影响不大。

1.1.3 香薷 花的内部有绒毛，花蜜被吸附。用毛细管采集不完全。

1.1.4 爵床和丛枝蓼 毛细管无法收集到这种花很小蜜量又少的花蜜。解剖镜下观察发现爵床的花蜜不成滴，而是一层液膜附在花瓣上，没有看见丛枝蓼的花蜜。只能用离心方法采集。

1. 2 注射器法

对于大的花使用注射器采集的方便性不言而喻，一些合适的小型花也可以用微量加样器进行采集。Pleasants和Chaplin(1983)将10 μL平针头的加样器插入马利筋属*Asclepias* L.植物*A. syriaca* L.的兜状瓣中收集并测量了花蜜的体积。Willson和Bertin(1979)甚至用微量加样器测量了近0.1 μL的蜜量。

用注射器法可以直接从管壁上读出体积，也可以将采集的蜜转移到其他的量具中测量。我们实验中使用的是1 μL和5 μL的加样器。

1.2.1 慈姑 雌花：边观察残余的蜜量边轻轻地上提活塞。由于在整个雌蕊群的基部一周都有花蜜分泌，注射器还要进行移动，所以非常容易吸入气泡造成结果不准确。解剖镜下观察到的残余蜜量和毛细管法的差不多，效果一般。雄花：由于雄花的花蜜都集中在丛状花丝的基部，不需要移动且不易吸入气泡，而且加样器的针头也比毛细管要细，不易粘上花粉也不易被堵塞，解剖镜下观察花蜜的残余量微乎其微，雄花用注射器法的效果好于雌花也好于用毛细管法。

1.2.2 扁豆 加样器的针头很细，可以将针头直接从花瓣上插入，对花的伤害不大，也没有组织液流出(当需要测量分泌速率而保持花的存活时可用70%的酒精擦拭针头)，在花的另一侧用灯光照射可以看见插入的针头的位置，将会对操作有很大的帮助。采集后花蜜的残余量同使用毛细管法一样也较多，不过可以不必将花解剖而保持其完整性。

1.2.3 爵床、香薷和丛枝蓼 这3种花单朵花蜜量太少不能用注射器法采集，即使勉强使用也会吸入气泡。

1.3 滤纸条法

当花蜜太稀或用毛细管法采集花蜜比较困难时可以使用滤纸条采集(McKenna & Thomson, 1988; Thomson et al., 1989)。优点是对于蜜腺不太隐蔽的花可不损伤组织就比较充分地采集到花蜜。也不会受到花粉的干扰。

将滤纸剪成宽度一致的细条，宽度根据花朵的大小灵活设定，用一定宽度的滤纸条的一端贴近花蜜腺处吸取花蜜，测量滤纸条上被花蜜润湿部分的长度，将标准体积的液体滴在相同宽度的滤纸条上作参照，滤纸条上的润湿长度将在一定范围内和花蜜体积成正比关系。

我们用双圈牌中速定性滤纸裁成1 mm和5 mm两种宽度的纸条，用标准体积的20%蔗糖溶液沾湿并测量沾湿的长度。结果表明在一定范围内，体积与沾湿长度成正比关系

(图1)。

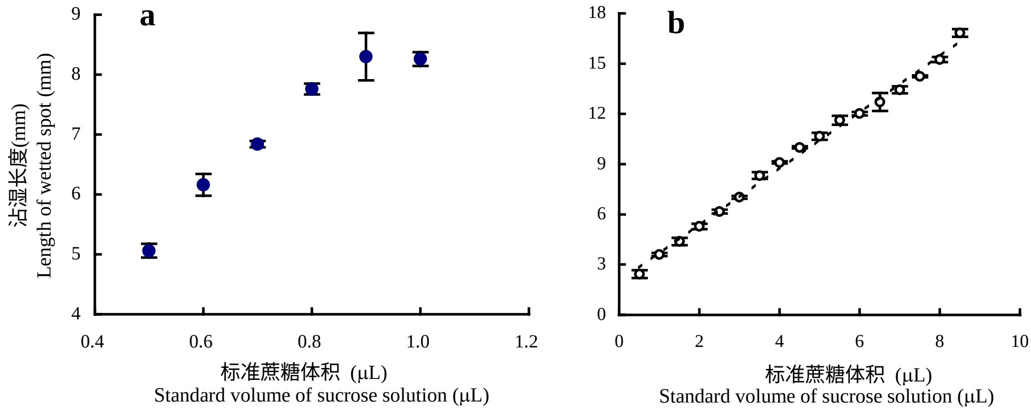

图 **1**　标准蔗糖体积与 1 mm 宽(a)和 5 mm 宽(b)的滤纸条沾湿长度的关系
Fig. 1.　The relationship between standard volume of sucrose solution and length of wetted filter paper with 1 mm (a) and 5 mm (b) width.

1.3.1　慈姑　雌花：使用5 mm以下宽度的滤纸条，用纸边轻触蜜腺处，与蜜腺充分接触。采集后解剖镜下观察花蜜残留很少。雄花：使用1–2 mm宽的滤纸条，方法同上。由于用沾湿面积来测量花蜜体积，所以不受花粉的影响。解剖镜下观察花蜜残留很少。

1.3.2　扁豆　可以使用5 mm以下宽度的滤纸条，蜜腺部分过于隐蔽，不易使滤纸条与蜜腺充分接触，而且蜜量过大，超出花蜜体积与滤纸条沾湿长度的线性关系范围。

1.3.3　爵床　使用1 mm宽的滤纸条，采集不佳。

1.3.4　香薷　花上有绒毛，不易采集到。

1.3.5　丛枝蓼　花太小，无法使用。

1.4　离心法

当花太小有蜜而不易用毛细管采集，或单朵花蜜量太小用以上几种方法不能采集时，可以用离心法采集。早在1950年Swanson和Shuel就使用离心的方法采集过花蜜。如果不要求保留活体花做后续的研究，用离心法采集花蜜基本可以满足一般的实验要求。对于十分小的花，单朵蜜量微小，可以将多朵花放在一个离心管中共同离心采集，采集到的花蜜可以用毛细管来测量其体积，再计算每朵花的平均花蜜量。

我们首先确定合适的离心力优化离心时间。参考Swanson和Shuel(1950)的465*g*的离心力。用慈姑雌花作为材料，将雌花用大头针固定在离心管盖子上。适当地增加离心力用4000 r/min和10000 r/min分别离心5 min、10 min和15 min，然后再在解剖镜下观察采集后的花的残余蜜量，发现4000 r/min离心10 min较为合适。离心10 min以后延长时间分离蜜量并不增加。而10000 r/min离心时花容易从管盖上脱落，而且过高的离心力也容易使花的组织液从伤口中流出，造成花蜜的污染。故使用低的离心力而适当地延长离心时间比较合适。

1.4.1　慈姑　雌花：用大头针固定于管盖4000 r/min离心10 min。解剖镜下观察，结果较

好，基本无花蜜残留。雄花：剪下一次性手套的一个手指部分，在尖端剪几个小口以让花蜜从小口中流下，将花粉用毛刷轻轻粘去后放入，再放入1.5 mL的离心管中，用管盖盖上时夹住其后半部分的塑料，使其尖端与离心管的底部留有一定距离。4000 r/min离心10 min。小心地将花取出，再将其翻过来离心数秒，让粘在上面的花蜜经离心进入离心管中。在解剖镜下观察花，发现用离心法采集的效果明显好于前几种方法。在丛状花丝的基部也没有花蜜残留。

1.4.2 扁豆 将花开口方向向下放入一次性手套的手指部分，同慈姑雄花的方法一样，4000 r/min离心10 min，然后将花转个方向再离心10 min(目的是避免花蜜在离心时被花组织托住)。同样也将一次性手套的手指部分翻过来离心数秒。解剖镜下观察，大部分花的花蜜残留很少，也有少量的花有蜜残留，原因可能是部分花蜜刚好被花瓣等从下面阻挡住。将花多转几个方向离心的效果会好得多。

1.4.3 爵床 单朵花蜜量较少，所以我们采取20朵花放在一起测量的方法。将花的管状开口都向下放在剪下的一次性手套的手指部分(方法同上)。4000 r/min离心10 min。收集到近0.2 μL的花蜜。解剖镜下观察离心后的花，没有蜜残留。

1.4.4 香薷 同爵床采用完全一样的方法。10朵花放在一起离心, 4000 r/min离心10 min收集到0.4 μL的花蜜。解剖镜下也没有发现有蜜残留。

1.4.5 丛枝蓼 离心法是这几种方法中唯一能收集到丛枝蓼的花蜜的。将30朵小花一起离心(方法同上)。4000 r/min离心10 min，共采集到0.2 μL。离心后的花在解剖镜下观察不到花蜜。

2 花蜜成分的测量

采集到的花蜜如果不马上进行成分分析，可以在离心管中于–20 °C保存。必要时用石蜡封住管口(Reader, 1977)，以免其中的酶等成分使其中的糖分和蛋白质等发生改变。

如果只是进行花蜜糖含量的测定，可以使用旋光测糖仪测量。很多工作者都使用过这种方法(Comba et al., 1999; Navarro, 2001; Castellanos et al., 2002; Zhang et al., 2003)，我们分别比较了3种手持式折光仪(hand-held refractometers)的测量范围和最小加样量。(1)BGRS(Bellingham and Stanley Ltd.)公司的型号为Code 45-81：最小加样体积0.2 μL，糖浓度测量范围0–50%; (2)ATAGO(Japan)的pocket RAL-1：最小加样体积0.3 mL，测量范围0–53%; (3)国内的成都泰华光学公司生产的手持式折光仪：最小加样体积1 μL，测量范围0–80%。用3种手持式折光仪测量浓度为5%的蔗糖溶液，3种的读数都较为准确，在5±0.2之内。因此3种手持式折光仪在花蜜含量测定中的主要区别在于最小加样量。

此外我们还对慈姑的花蜜进行了测量。发现加样后随着时间的推移各种仪器的读数都会上升，而测量蔗糖则没有这种情况。原因可能是水分蒸发或花蜜中某些酶的作用所致。故加样后应该迅速读数。

当需要较为精确的成分分析时，可以选用色谱分析的方法。其优点是要求的加样量较小而且结果精确、耗时较短。缺点是成本较高，如果色谱仪的色谱柱不全，则只能进行部分成分的分析。

3　讨论

本文尝试使用了4种方法分别对5种不同的植物进行花蜜的采集，这5种植物有花蜜显露的皿状花(如慈姑)、有花蜜隐藏的蝶形花(如扁豆)、有蜜量很少的爵床、香薷和花细小的丛枝蓼。我们选择这些花蜜不容易采集的植物，目的就是期望寻找在野外广泛适用的方法。

毛细管法是这几种方法中最容易操作也是适用性最强的一种方法。适用于花蜜比较集中的花，如蜜腺过于开放，花蜜无法聚集成滴，则采集效果不好。除了部分特别小的花，毛细管法能满足大多数花的花蜜采集需要。为保证测量的准确性，很多学者建议每次采集用新的毛细管。如果想回收，要经过酒精浸泡、洗净后可再使用(Corbet, 2003)。注射器法比较适合大的花，花蜜成滴，如鹅掌楸*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. (黄双全等，1999)。注射器法的优点是可以更容易地插到花的深部，还可以从花瓣上刺入而对其伤害很小(使用微量加样器)。缺点是很容易吸上气泡造成测量的不准确，适用性较差。

滤纸条法对体积的测量不十分精确，但在采集蜜量少和暂时存放用于成分检测的花蜜时却十分方便。此法可以不受花粉的影响。对于花蜜呈一薄层平铺在花上时其采集效果明显好于毛细管法和注射器法。如果使用滤纸条法采集花蜜用于成分分析，则在采集后自然干燥，放入小培养皿或离心管中保存(Ashman & Stanton, 1991)。注意不可以用手接触滤纸条，以免影响氨基酸的分析。

离心法适用于各种大小和蜜量的花，但是必须将花与植株分离，无法进行活体花蜜分泌速率的研究。当需要活体测量时只能采用其他的方法。在使用离心法时要注意花的组织液污染问题。一般花在被剪下时伤口处会流出一些组织液，采蜜之前应该在空气中稍放置一段时间，组织液挥发的速率要比花蜜快得多。当花含水量较大时用离心法的精确性就会下降很多。另外，离心力的大小也应该根据花的情况而定，一般尽量选择小的离心力而稍延长离心时间，以减少组织液的污染。

当花的蜜量很小，而且比较黏稠不易采集时可以使用换洗(rinsing)的方法。在花的蜜腺处加入一定体积的蒸馏水，再用毛细管吸出。换洗两次后可提取达95%的花蜜(Mallick, 2000)。但此方法只适用于花蜜的成分分析，体积测量误差较大。

在测量花蜜的成分时，一般的仪器都是利用光的折射原理工作的。我们建议使用BGRS公司的手持式折光仪，其加样量要求小(最小可达0.2 μL)，操作性和精确性也较好。成都泰华光学公司生产的手持式折光仪精确性也很好，使用方便。

通过在5种植物中比较不同的花蜜采集方法，结果显示不同的植物需要选择合适的方法。对于花小、花蜜不易采集的植物我们建议采用离心的方法。我们的对比实验支持Corbet(2003)根据自己的经验提出的建议：在一般的野外工作中，花蜜的采集使用毛细管法，糖含量的测定使用便携式的折光仪。

致谢　感谢中国科学院西双版纳植物园李庆军、高江云先生对本工作提供的帮助；本室研究生唐璐璐、孙继凡、卢洋、予茜等给予有益的建议。

参 考 文 献

Adler L S. 2000. The ecological significance of toxic nectar. Oikos 91: 409–420.

Ashman T L, Stanton M L. 1991. Seasonal variation in pollination dynamics of the sexually dimorphic species, *Sidalcea oregana* ssp. *spicata* (Malvaceae). Ecology 72: 993–1003.

Baker H G, Baker I. 1973. Amino acids in nectar and their evolutionary significance. Nature 241: 543–545.

Castellanos M C, Wilson P, Thomson J D. 2002. Dynamic replenishment of nectar in *Penstemon* (Scrophulariaceae). American Journal of Botany 89: 111–118.

Comba L, Corbet S A, Barron A, Bird A, Collinge S, Miyazaki N, Powell M. 1999. Garden flowers: Insect visits and the floral reward of horticulturally-modified variants. Annals of Botany 83: 73–86.

Corbet S A. 2003. Nectar sugar content: estimating standing crop and secretion rate in the field. Apidologie 34: 1–10.

Cruden R W, Hermann S M. 1983. Studying nectar? Some observations on the art. In: Bentley B, Elias T eds. The Biology of Nectaries. New York: Columbia University Press. 223–241.

Huang S-Q (黄双全), Guo Y-H (郭友好), Pan M-Q (潘明清), Chen J-K (陈家宽). 1999. Floral syndrome and insect pollination of *Liriodendron chinense*. Acta Botanica Sinica (植物学报) 41: 241–248.

Irwin R E, Adler L S, Agrawal A A. 2004. Community and evolutionary ecology of nectar. Ecology 85: 1477–1478.

Kearns C A, Inouye D W. 1993. Techniques for Pollination Biologists. Niwot: University Press of Colorado.

Mallick S A. 2000. Technique for washing nectar from flowers of Tasmanian leatherwood (*Eucryphia lucida* Eucryphiaceae). Austral Ecology 25: 210–212.

McKenna M A, Thomson J D. 1988. A technique for sampling and measuring small amounts of floral nectar. Ecology 69: 1306–1307.

Navarro L. 2001. Reproductive biology and effect of nectar robbing on fruit production in *Macleania bullata* (Ericaceae). Plant Ecology 152: 59–65.

Pleasants J M, Chaplin S J. 1983. Nectar production rates of *Asclepias quadrifolia*: causes and consequences of individual variation. Oecologia 59: 232–238.

Reader R J. 1977. Bog ericad flowers: self-compatibility and relative attractiveness to bees. Canadian Journal of Botany 55: 2279–2287.

Swanson C A, Shuel R W. 1950. The centrifuge method for measuring nectar yield. Plant Physiology 25: 513–520.

Thomson J D, Mckenna M A, Cruzan M B. 1989. Temporal patterns of nectar and pollen production in *Aralia hispida*: implications for reproductive success. Ecology 70: 1061–1068.

Willson M F, Bertin R I. 1979. Flower-visitors, nectar production, and inflorescence size of *Asclepias syriaca*. Canadian Journal of Botany 57: 1380–1388.

Zhang L, Li Q-J, Deng X-B, Ren P-Y, Gao J-Y. 2003. Reproductive biology of *Alpinia blepharocalyx* (Zingiberaceae): another example of flexistyly. Plant Systematics and Evolution 241: 67–76.